

氏名	村岡 理奈
学位の種類	博士（歯学）
学位授与番号	第114号
学位授与の日付	2011年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当（博士課程修了）
学位論文題目	Immunohistochemical Expression of Heat Shock Proteins in the Mouse Periodontal Tissues due to Orthodontic Mechanical Stress （歯科矯正学的メカニカルストレスによるマウス歯根膜組織におけるHSPsの免疫組織化学的発現）
指導教員	（主）教授 川上 敏行 （副）教授 平岡 行博 （副）教授 山田 一尋 （副）教授 吉澤 英樹
論文審査委員	主査 教授 中村 浩彰 副査 教授 岡藤 範正 副査 教授 吉成 伸夫

学位論文の内容の要旨

【背景・目的】細胞傷害性刺激の負荷により発現するであろう Heat Shock Proteins（HSPs）について、実験的歯の移動に伴う歯根膜組織での動態やその役割についてはこれまでほとんど追究されていない。そこで本研究では、マウスを用いて歯の移動実験を行い、この発現状況の変化について免疫組織化学的に検討した。

【材料・方法】実験動物として8週齢の ddY 雄性マウスを使用し、Waldo 法によりマウスの上顎臼歯間にセパレーターを挿入して歯科矯正学的なメカニカルストレスを負荷した。実験開始後、経時的に当該部マウス上顎臼歯部歯周組織を摘出し固定、脱灰後、パラフィン連続切片標本を作製し、免疫組織化学的に HSP27 および p-HSP27 の発現状況を検討した。

【結果・考察】免疫組織化学的検討において、対照群の歯根膜線維芽細胞はその全周にわたって HSP 27 と p-HSP27 の活性が低い状態で保たれていた。これは HSP27、p-HSP27 は平常時においても弱発現し、歯根膜組織のホメオスタシスの維持や歯根膜線維芽細胞の活性化による組織の修復に密接に関与しているためだと考えられる。また、実験群では、HSP27 は10分で牽引側の歯根膜線維芽細胞に免疫陽性反応がみられ、時間の経過とともに増強し、9時間では歯根膜線維芽細胞、骨芽細胞にも強く発現していた。p-HSP27 も経時的に陽性反応の増強を示したが、HSP27 の発現を追うように、若干遅れていた。また、この時期の牽引側歯根膜組織には Runx2 などの骨芽細胞の活性化を誘導する因子の発現があり、HSP27 は骨添加傾向への分子シャペロンとして働いている可能性が強いと考えられる。

【結論】HSPs の発現は、歯根膜組織に対するメカニカルストレスにより誘導されたものと考えられ、HSP27 が p-HSP27 として牽引側歯根膜線維芽細胞の活性化によるホメオスタシスの維持、同部の骨添加傾向に大きくシフトするシグナルに対する分子シャペロンとして働いていることを強く示唆し

た。

学位論文審査の結果の要旨

本研究は、歯根膜細胞を構成する特異な歯根膜線維芽細胞に着目し、メカニカルストレスにより引き起こされる歯根膜線維芽細胞における免疫組織化学的变化として HSP27 および p-HSP27 の役割を明らかにすることを目的に行なわれ、意義深い研究成果を得ている。

従来、HSP27 は細胞内において分子シャペロンとして機能することが推測されているが、*in vivo* における研究は少なく、とくに歯周組織にメカニカルストレスをかけることにより発現する HSP27、p-HSP27 両者の関係をみている実験はない。本研究は、これを *in vivo* で追究したものであり、その点からも意義深いものであると評価できる。

本研究は 8 週齢の ddY 雄性マウスを用いて、メカニカルストレス負荷後の歯根部組織について、病理組織学的、免疫組織化学的手法によって検索を行なっている。本研究にて用いた研究手法は合理的であると判断した。得られた結果は、大きくは以下の 3 項目である。免疫組織化学的に、①対照群の歯根膜線維芽細胞の細胞質全域に HSP27 と p-HSP27 の弱い活性が認められた。②メカニカルストレス負荷後の HSP27 は 10 分という短時間で牽引側歯根膜線維芽細胞に発現し、時間の経過とともに増強していた。③p-HSP27 は HSP27 よりも少し遅れてとくに 9 時間以降に発現していた。

以上のように本論文では、メカニカルストレスにより引き起こされる歯根膜線維芽細胞における HSP27 および p-HSP27 の免疫組織化学的变化を検討し、歯根膜組織のホメオスタシスの維持や歯根膜線維芽細胞の活性化による組織の修復に HSP27、p-HSP27 が密接に関与しているということが強く示唆された。また、HSP27 は牽引側歯根膜組織に発現する骨芽細胞の活性化因子による骨添加傾向への分子シャペロンとして働いていることを示唆する、という重要な結論を導き出した。本研究における仮説と実験手法は妥当であり、得られた結果は、結論を支持するものであった。また、この実験は松本歯科大学動物実験委員会の審査、承認のもとに行われている。

本論文は本学大学院歯学独立研究科口腔疾患制御再建学専攻の学位論文として、歯科とくに基礎歯科医学のみならず、臨床歯科医学とりわけ歯科矯正領域の研究にも多くの示唆を与える内容を含んだ意義のある研究であると評価した。以上のことより、本論文に学位論文としての価値を認める。

なお、本論文は「Immunohistochemical Expression of Heat Shock Proteins in the Mouse Periodontal Tissues due to Orthodontic Mechanical Stress」というタイトルで、2010年11月発行の European Journal of Medical Research 誌 [15巻11号] に掲載予定 (2010年7月29日受理) のものである。

最終試験の結果の要旨

申請者の学位申請論文「Immunohistochemical Expression of Heat Shock Proteins in the Mouse Periodontal Tissues due to Orthodontic Mechanical Stress (歯科矯正学的メカニカルストレスによるマウス歯根膜組織における HSPs の免疫組織化学的発現)」を中心に、本研究に関する基礎知識、論文内容、研究成果、今後の展開などについて、口頭による試験を行なった。質問事項 (順不同) は次のとおりである。

1. 生理的条件下においても持続的刺激が加わらないと HSP は発現しないのか
2. HSP が発現している時期に、アポトーシスや細胞増殖の所見はみられたか
3. HSP は歯根膜細胞の増殖、分化に関連する分子のシャペロンとして機能する可能性があると考えてよいのか
4. 学位論文における最大の新知見は何か
5. 実験開始から24時間後にセパレーターを除去した場合の反応はどうか
6. 実験後9時間以前の圧迫側に HSP が発現しない理由はどのように考えるか
7. HSP27 と p-HSP27 の一次抗体の種類の違いによる染色性に違いはあったか
8. 今後、本研究は将来どのように発展させるのか

以上の質問に対して、申請者は最新の文献的知見も踏まえて適切に回答した。また、申請者は本研究を遂行するにあたり、病理組織学的染色法および免疫組織化学的染色法などの形態的実験方法を習得しており、実験より得られた結果に対して適切な考察が行える専門的知識を有しており、博士課程修了者として十分な知識と技術を習得していると判断された。本審査委員会は、申請者が博士（歯学）として十分な学力および見識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。